

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-506456

(P2003-506456A)

(43) 公表日 平成15年2月18日 (2003.2.18)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマコード* (参考)

C 0 7 K 1/14

C 0 7 K 1/14

4 B 0 2 9

1/34

1/34

4 B 0 5 0

C 1 2 M 1/32

C 1 2 M 1/32

4 B 0 6 3

C 1 2 N 9/10

C 1 2 N 9/10

4 H 0 4 5

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/02

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-515694 (P2001-515694)

(86) (22) 出願日 平成12年8月2日 (2000.8.2)

(85) 翻訳文提出日 平成14年2月5日 (2002.2.5)

(86) 国際出願番号 PCT/EP00/07478

(87) 国際公開番号 WO01/010886

(87) 国際公開日 平成13年2月15日 (2001.2.15)

(31) 優先権主張番号 199 37 187. 3

(32) 優先日 平成11年8月6日 (1999.8.6)

(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), JP, US

(71) 出願人 キアゲン ゲゼルシャフト ミット ベシ
シュレンクテル ハフツング

ドイツ連邦国、ヒルデン 40724、マックス
フォルマー シュトラッセ 4

(72) 発明者 リーベ ヨアヒム

ドイツ連邦国、デュッセルドルフ ディー
40223、ゴグレフシュトラッセ 3

(72) 発明者 シェファール フランク

ドイツ連邦国、デュッセルドルフ 40627、
アイヘンヴァンド 26

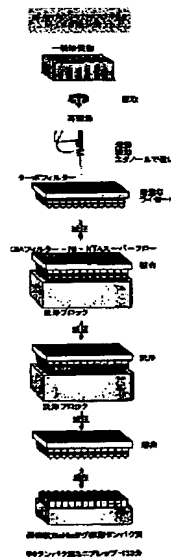
(74) 代理人 弁理士 塩澤 寿夫 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マルチウェルにおける減圧濾過による自動タンパク質精製

(57) 【要約】

本発明は、不溶性成分を含有する複数のタンパク質含有溶液をマルチチャンバ濾過ユニットの個々のチャンバ中に調製し、圧力差をかけ、マルチチャンバ濾過ユニットを通してその溶液を濾過することによって、不溶性成分を除去すると同時に、隣接チャンバ間の相互汚染を化学的および/または機械的手段によって防止し、個々の濾液を回収容器に別々に回収する段階を含む、生物サンプルから細胞内容物を含有する清澄な溶液をハイスルーブット法で得る方法および試薬キット、ならびに得られた清澄な溶液から細胞内容物を回収する方法に関する。本発明はさらに、生物サンプルから清澄なタンパク質含有溶液を回収する装置の使用に関する。



BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞内容物を含有する、生物サンプルの清澄な溶液をハイスループット法で回収する方法であって、

(a) マルチチャンバ濾過ユニットの個々のチャンバ中に不溶性成分を含有する複数のタンパク質含有溶液を調製する段階と、

(b) 前記溶液を、圧力差をかけることによって前記マルチチャンバ濾過ユニットに通して濾過し、不溶性成分を除去する段階であって、隣接チャンバの相互汚染が、化学的手段および／または機械的手段によって防止される段階と、

(c) 個々の濾液を回収容器中に別々に回収する段階と、を含む方法。

【請求項2】 前記相互汚染が、泡立ちを減少させることによって防止されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記泡立ちが、細胞ライセートに消泡剤を添加することによって減少されることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 前記消泡剤が、第一、第二もしくは第三C₁～₆アルコール、シリコーン消泡剤、非シリコーン消泡剤、植物をベースとする消泡剤、長鎖アルカン、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物から選択されることを特徴とする、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記相互汚染が、前記マルチチャンバ濾過ユニットの出口端と、前記回収容器の入口端との間に移送ユニットを用いることによって防止されることを特徴とする、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】 (a) によるタンパク質含有溶液が、未精製細胞ライセートであることを特徴とする、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】 前記細胞溶解が、前記マルチチャンバ濾過ユニットの個々のチャンバ中で行われることを特徴とする、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 前記マルチチャンバ濾過ユニット内のフィルター孔径が、フィルターを通る濾液の流れの方向にしたがって小さくなることを特徴とする、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】 (c) による濾液から細胞内容物を回収することをさらに含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】 少なくとも1つの追加の濾過段階を含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 少なくとも1つのクロマトグラフィー分離段階および／または沈殿段階を含む、請求項9または10に記載の方法。

【請求項12】 イオン交換マトリックスを用いた、クロマトグラフィー分離段階を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 アフィニティーマトリックスを用いた、クロマトグラフィー分離段階を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項14】 前記アフィニティーマトリックスが、金属キレートアフィニティーマトリックスであることを特徴とする、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 前記金属アフィニティーマトリックスが、Ni-NTAマトリックスであることを特徴とする、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記マトリックスが、懸濁液であることを特徴とする、請求項12から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】 少なくとも1つの洗浄段階をさらに含む、請求項9から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】 前記液体が、圧力差をかけることによって分離されることを特徴とする、請求項9から17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】 廃棄されるべき液体が、排液ユニットを用いて除去されることを特徴とする、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 前記細胞内容物を分析する、少なくとも1つの段階をさらに含む、請求項9から19に記載の方法。

【請求項21】 前記細胞内容物が、マルチチャンバユニット中に回収されることを特徴とする、請求項9から20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】 前記細胞内容物が、ペプチド、ポリペプチド、核酸、および代謝産物から選択されることを特徴とする、請求項9から21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】 生物サンプルから清澄なタンパク質含有溶液を回収するための、

マルチチャンバユニットを第1位置に保持する手段と、
マルチチャンバユニットを第2位置に保持する手段と、
第1位置にある少なくともマルチチャンバユニットの入口端と出口端との間に
圧力差をかける手段と、

第1位置にある少なくともマルチチャンバユニットの個々のチャンバに試薬を
添加する手段と、を備える装置の使用。

【請求項24】 第1位置にある1つのユニットのチャンバ出口が、第2位置にある1つのユニットのチャンバ入口と整列するように、前記マルチチャンバユニットが位置合わせされることを特徴とする、請求項23に記載の使用。

【請求項25】 前記装置が、
マルチチャンバユニットを第1位置から取り外す手段と、
マルチチャンバユニットを第2位置から第1位置へ移す手段と、
マルチチャンバユニットを第2位置へ移す手段と、を備えることを特徴とする、請求項23または24に記載の使用。

【請求項26】 前記装置がさらに、マルチチャンバ移送ユニットを備えることを特徴とする、請求項23から25に記載の使用。

【請求項27】 前記装置がさらに、マルチチャンバ排液ユニットを備えることを特徴とする、請求項23から26に記載の使用。

【請求項28】 前記装置がさらに、第1位置および/第2位置にあるマルチチャンバ出口端に、前記マルチチャンバ排液ユニットを取り外し可能に取り付ける手段を備えることを特徴とする、請求項27に記載の使用。

【請求項29】 前記装置がさらに、細胞内容物を分析する手段を備えることを特徴とする、請求項23から28に記載の使用。

【請求項30】 前記装置がさらに、少なくとも1つのプロセス段階を制御するソフトウェアを備えることを特徴とする、請求項23から29に記載の使用。

【請求項31】 生物サンプルからタンパク質含有溶液をハイスループット法で得るための試薬キットであって、

(a) 少なくとも1つのマルチチャンバ濾過ユニットと、

(b) 消泡剤および／または少なくとも1つのマルチチャンバ移送ユニットと

(c) 任意に、少なくとも1つのマルチチャンバ受け入れユニットと、を含む試薬キット。

【請求項32】 細胞溶解に使用するための、少なくとも1種類の試薬をさらに含む、請求項31に記載の試薬キット。

【請求項33】 タンパク質および／またはペプチドを可溶化するための、少なくとも1種類の試薬をさらに含む、請求項31または32に記載の試薬キット。

【請求項34】 クロマトグラフィー物質をさらに含む、請求項31から33のいずれか一項に記載の試薬キット。

【請求項35】 前記クロマトグラフィー物質が、少なくとも1つのマルチチャンバクロマトグラフィーユニットの形をとる、請求項34に記載の試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、ハイスループット法で生物サンプルから細胞内容物を含有する清澄な溶液を得て、その得られた清澄な溶液から細胞内容物を回収する方法および試薬キットに関する。本発明はさらに、タンパク質を含有する清澄な溶液を回収するための自動装置の使用に関する。

【0002】

生化学および分子生物学分野においては、特にスクリーニングで、所望のクローンを同定するため、または例えば生物サンプルの細胞内容物の存在もしくは含有量を決定するために、さらに綿密に多数の生物サンプルを検査することがしばしば必要とされる。費やす時間、そのためのコストおよびエラーの可能性を低減するために、手順を単純化するための方法またはシステムが過去に開発されてきた。作業負担を低減することを目的とする1つのアプローチは、マイクロタイタープレート、例えばこれに適したマルチピペットもしくはマイクロタイタープレートを保持することが可能なロータインサート (rotor insert) など、多数のサンプルの同時処理を可能にするシステムを提供することにあった。他のアプローチでは、例えば適切なロボットを用いることによって、個々のプロセス段階を可能な限り自動化することに着手している。

【0003】

フェレイセン (Felleisen) 等 (Biotechniques 20, 616-620(1996)) は、組換えマルトース結合タンパク質 (MBP) 融合タンパク質を96穴フォーマットで精製する方法を記述している。この方法では、従来の手法で調製し、96穴プレートのウェル中に配置した清澄な細胞ライセートから始まり、上清中に含有されるMBP融合タンパク質をマルトース被覆表面に結合させ、過剰のマルトースまたは変性剤を添加することによって、そのMBP融合タンパク質を溶出する。この方法の不利な点は、清澄な細胞ライセートを遠心分離によって調製するため、自動化されておらず、かつ自動化できないことである。この方法は、変性条件下では使用できず、未変性条件下でのみ使用することが可能であり、低収量となる (1ウェルにつき約2 μ g)。

【0004】

ベル (Bell) 等(<http://www.apbiotech.com/publications/LSN-1-5/gst-micro.htm>, 1999)は、24までの組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質を同時精製する方法を記述している。清澄な細胞ライセートを遠心分離によって調製し、個々のミクロクロマトグラフィーカラムに加える。それに続いて、遠心分離するかまたは減圧することによって、結合および洗浄ステップを行う。溶出は、還元されたグルタチオンを個々の微量反応容器に加えることによって行う。この方法の不利な点は、清澄な細胞可溶化物を遠心分離によって調製するため、自動化されておらず、かつ自動化できないことである。このプロセスは、未変性条件下でのみ行うことが可能であり、24サンプルのみを同時処理することができる。さらに、個々の反応容器を使用するため、混同を生じる可能性が高い。

【0005】

シェアー (Sheer) およびピット (Pitt) (構造解析のためのタンパク質及びペプチドのハイスループットサンプル調製 (High Throughput Sample Preparation of Proteins and Peptides for Structural Characterization), Poster Nr.446-OT, 13-15 July 1997, 11th Symposium of the Protein Society, Boston, MA)は、「マルチスクリーンカラムローダー」を用いて、乾燥粉末クロマトグラフィー物質を96穴マイクロタイタープレートに充填する方法を記述している。物質を膨潤させ、平衡化した後、クロマトグラフィーによって96バッチを同時処理することが可能であり、そのすべての段階が遠心分離によって行われる。この方法は、クロマトグラフィー精製にのみ適用され、サンプルの調製には適用されない。

【0006】

上記の文書には、同時バッチでのタンパク質の精製が記載されているが、記載の形式ですべてが自動化されているわけではなく、かつ自動化することもできない。使用する出発原料は、各ケースにおいて清澄な細胞ライセートであり、従来の手法、例えば個々のサンプルを遠心分離し、上清を除去することによって生成されている。これは、非常に多くの取り扱い段階を必要とし、したがって非常に

時間がかかり、サンプルを混同する可能性が生じる。

【0007】

ドイツ特許第4230089号には、固相合成から得た30までの合成ペプチドを全自動で処理する実験用ロボットが記載されている。例えば、細胞または細胞抽出物などの生物素材の処理は開示されていない。

【0008】

欧州特許第A-0376080号には、遠心分離段階を用いることなく、DNAを抽出および精製する方法が記載されている。特にハイスループット法での多数のサンプルの同時処理は開示されていない。

【0009】

欧州特許第A-0249932号には、プロセス規模で生理活性物質を自動精製する方法が開示されている。この方法は、分離する目的物質よりも低い分子量を有する物質を分別するマクロ濾過、限外濾過と、アフィニティークロマトグラフィー段階による細胞または細胞成分の分離に基づくものである。特にハイスループット法による物質の同時精製は開示されていない。

【0010】

上記の欧州特許出願には、細胞もしくは細胞懸濁液からDNAまたはタンパク質を精製する、自動化可能な方法が記載されている。しかしながら、ハイスループット法ではなく、個々のサンプルからこれらの物質を生成する方法のみが開示されており、したがって、ハイスループットの適用で生じる特殊な状況は考慮に入れられていない。

【0011】

各サンプル間の間隔が狭いため、ハイスループットの適用では、隣接するウェルまたはチャンバからの溶液による相互汚染という考慮すべき問題がある。特に濾過する目的の溶液が、激しく泡立つ傾向がある場合、特にマルチチャンバ濾過ユニットを用いた濾過段階でこの可能性がある。この問題は、細胞培養液から清澄なライセートを生成する際、特に深刻である。このため、公知の同時プロセスは、従来の手法で得た、つまり遠心分離によって得た清澄な細胞ライセートから開始される。上記の従来技術を参照のこと。

【0012】

このように、本発明が基礎とする課題は、生物サンプルから、特に細胞または細胞懸濁液または未精製ライセートから、清澄な溶液を同時に得るための簡易かつ迅速な方法を提供することである。

【0013】

一態様において、本発明は次のように、生物サンプルから細胞内容物を含有する清澄な溶液をハイスループット法で得る方法であって：

(a) 不溶性成分を含有するタンパク質含有溶液を、マルチチャンバ濾過ユニットの個々のチャンバ中で調製する段階と、

(b) マルチチャンバ濾過ユニットに通し、圧力差をかけることによって、その溶液を濾過して、不溶性成分を除去する段階であって、隣接チャンバ間の相互汚染が、化学的手段および／または機械的手段によって防止される段階と、

(c) 回収容器中に個々の濾液を別々に回収する段階と、を含む方法に関する。

【0014】

本出願では、生物サンプルという語句は、生物素材を含有するサンプルを意味する。生物素材は、例えば各種の組織、骨髄、ヒトおよび動物の体液、例えば血清、血漿、尿、精液、脳脊髄液、痰、およびスメア、植物、植物成分および植物抽出物、例えば植物液、菌類、微生物、例えば細菌またはウイルス、原核細胞および／もしくは真核細胞または細胞培養、化石化もしくはミイラ化したサンプル、土壌サンプル、清澄化した汚泥、汚水および食物から生じる。特に、生物サンプルは、組換え素材、例えば組換え技術によって改変された真核細胞および／または原核細胞を含有する場合がある。

【0015】

タンパク質含有溶液は、生物素材からのペプチドおよび／またはポリペプチドを可溶型で含有する。例えば、これらの可溶性ペプチドおよび／またはポリペプチドは、生物サンプル中に存在する分泌物であり、かつ／または生物サンプル中の細胞によって分泌される。あるいは、それらは、細胞内で生じるか、または組換えにより発現し、細胞の分解によって放出されたペプチドおよび／またはポリ

ペプチドである。特定の一実施形態では、タンパク質含有出発溶液（つまり、不溶性成分を含有する溶液）は、未精製細胞ライセートであり、その溶解はタンパク質可溶化条件下で行われる。さらに、タンパク質含有出発溶液は、未精製細胞ライセートの画分であってもよい。ライセート画分を得る一方法は、例えば、タンパク質沈殿条件下で溶解を行い、核酸を分離し、タンパク質可溶化条件下で再度その残渣を回収することである。

【0016】

「清澄な溶液」および「濾液」という表現は、本明細書中では同意語として使用され、例えば細胞片などの不溶物を実質上含まない溶液を意味するものである。

【0017】

それらの溶液は一般に、異なる起源のものであるが、同一サンプルのアリコートを同時処理する用途を考案することも可能である。

【0018】

本明細書において、「ハイスループット」という用語は、少なくとも24サンプル、好ましくは少なくとも48サンプル、最も好ましくは96サンプル以上、例えば384サンプルの同時処理を意味する。

【0019】

一実施形態に従って、泡立ちを減らすことにより、相互汚染を防止する。かかる泡立ちは、タンパク質含有溶液を濾過する際、マルチチャンバ濾過ユニットの個々のチャンバからの出口で生じる。形成する泡の上部が、隣接するチャンバ出口の泡と一体化し、相互汚染が引き起こされる。ライセート1ml当たり0.1mg以上のタンパク質濃度を有するライセートを濾過する際、泡立ちが観察される。泡立ちは、タンパク質を含有する（複合）培地の濾過でもまた観察される。かかる培地は専門家には公知であり、例えば酵母菌の抽出物（例えばLB、TB、dYTおよびYP培地）、動物および植物組織の一部消化された抽出物（例えばトリプトン、ペプトン、大豆ペプトン）、例えばカゼイン、ラクトアルブミンまたはゼラチンまたは血清成分の加水分解物を含有するか、あるいは、血清を含有しないタンパク質強化培地（例えばCHO-S-SFMI I）である。培地1

ml 当たり 0.01mg 以上のタンパク質含有量で激しい泡立ちが生じる。

【0020】

本発明の好ましい実施形態では、タンパク質含有溶液に消泡剤を添加することによって、特にタンパク質含有溶液を消泡剤で被覆することによって、泡立ちを減らす。適切な消泡剤には、例えば第一、第二もしくは第三アルコール、特にC₁~₆アルコール、シリコン油もしくはそのエマルジョンをベースとする消泡剤、例えばAntifoam A (SIGMA社)、Wackerシリコン消泡剤エマルジョンSRE (antifoam reagent DX、Wacker社) またはDow Corning消泡剤MSA化合物 (Dow Corning社)、非シリコン有機消泡剤またはそのエマルジョン、例えばAntifoam 204 (SIGMA社)、植物をベースとする消泡剤、特にアルコキシル化脂肪酸エステル、例えばStructol J673 (Schill and Sailacher社)、長鎖アルカン (C₈以上)、鉱油、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどのポリグリコール、およびそれらの混合物、例えばシリコンおよび非シリコン消泡剤を含有する混合物、例えばAntifoam 289 (SIGMA社) が含まれる。消泡剤は、アルコール、特にエタノールまたはイソプロパノールであることが好ましい。

【0021】

消泡剤の濃度は、消泡物質の種類に応じて異なり、例えばアルコール、特にエタノールは濃縮状態で使用されるのに対して、シリコン油をベースとする消泡剤は約0.1%の濃度で使用する。

【0022】

好ましい実施形態のように、消泡剤を上注ぐことによって添加する場合には、必要な消泡剤の容積は、チャンバの直径または消泡剤の液体のカラムによって異なる。つまりタンパク質含有溶液の容積にはほとんど依存しない。さらに、その容積は、消泡剤の種類にも依存する。消泡剤としてエタノールを用いた場合、範囲0.05cm~1cm、好ましくは0.1cm~0.3cm、特に約0.2cmのカラム高さで良好な結果が得られることを見出した。(チャンバ直径0.8cmを基準とする；チャンバの直径を変更する場合、カラム高さに調整が必要

である)

【0023】

本発明の他の実施形態に従って、マルチチャンバ濾過ユニットの出口端と回収容器の入口端との間にマルチチャンバ移送ユニットを使用することによって、相互汚染が防止される。「マルチチャンバ移送ユニット」とは、個々の流路を有するユニットであって、その入口開口部が、マルチチャンバ濾過ユニットの個々のチャンバ出口開口部に対応し、その出口開口部が、回収容器の入口開口部に対応するユニットを意味する。入口端において、移送ユニットは、マルチチャンバ濾過ユニットの出口開口部に対して、実質上密閉する手法で嵌合し、泡立ちによる相互汚染を防ぐ。その出口端において、回収容器入口開口部の非密閉嵌合は、マルチチャンバ濾過ユニットの入口端と出口端との間に圧力差をかけることができるように設けられる。代替方法としては、マルチチャンバ濾過ユニットの出口端において、マルチチャンバ濾過ユニットの入口端と回収容器の予想出口端との間に圧力差をかけることができるように、回収容器の入口端で密閉を提供する。回収容器がグロマトグラフィーのマトリックスを含む場合、出発溶液の濾過および、例えば精製する目的の細胞内容物のマトリックスへの結合など他の処理は、減圧段階で行う（以下を参照のこと）。移送ユニットは例えば、封止マットと、内腔を備えたアルミニウム製、ガラス製もしくはプラスチック製ブロック、またはそれに対応するチューブもしくはホースの配置とからなる。

【0024】

特定の一実施形態では、本発明による方法は、マルチチャンバ濾過ユニットの個々のチャンバで調製される未精製細胞ライセートから始まる。その細胞ライセートは、細胞もしくは細胞懸濁液を溶解試薬と混合することによって予め調製しておくか、あるいは細胞および溶解物質を添加し、任意にインキュベーションすることによって、マルチチャンバ濾過ユニットの個々のチャンバ中で直接溶解を行う。溶解は、タンパク質可溶化条件下で行うか、または1つまたは複数の画分を分離した後、タンパク質の可溶化段階を含む。

【0025】

マルチチャンバ濾過ユニットの入口端と出口端との間に圧力差、出口端で一般

的な低い圧力をかけることによって、タンパク質含有溶液を不溶性成分から分離する。その圧力差は、入口端で過剰圧力をかけるか、または好ましくは出口端で減圧することによって生じさせることができる。

【0026】

マルチチャンバ濾過ユニットの個々のチャンバに存在するフィルターは、フィルターを通る濾液の流れの方向にしたがって孔径が小さくなるフィルターが好ましい。この種のフィルターは、さらに詳しい記載がある、欧州特許第0616638 B1号に記載されている。この種のフィルターは、粗いフィルターの利点（フィルター細孔の最小限の閉塞）と細密メッシュフィルターの利点（微細な不溶性成分の良好な保持）を兼ね備えている。しかしながら、均一な孔径を有する従来のフィルターもまた適している。

【0027】

濾過段階後、回収容器中に、便宜上マルチチャンバユニットの個々のチャンバ中に、濾液を別々に回収する。特に、本発明が、清澄な溶液をさらに処理するものである場合、このマルチチャンバユニットは一般に、追加の濾過ユニットまたはクロマトグラフィーユニットである。

【0028】

特定の一実施形態では、本発明による方法は、この方法で得た濾液から細胞内容物を回収することを含む。この目的のために、この方法は、例えば1つまたは複数の追加の濾過段階、例えば目的の細胞内容物より低い分子量を有する物質を分離する限外濾過、およびサンプル容積を低減する濃縮段階を含む。

【0029】

細胞内容物を回収するために、この方法は、少なくとも1つのクロマトグラフィー分離段階および／または沈殿段階を含むことが好ましい。沈殿段階は、例えば核酸を沈殿させるのに十分な濃度でエタノールを添加すること、またはペプチドを沈殿させるのに十分な濃度でエーテルを添加することを含む。クロマトグラフィー分離段階は、適切なクロマトグラフィー物質に所望の細胞内容物を結合させ、その上清を除去し、次いでその内容物を溶出することを含む。

【0030】

クロマトグラフィー物質は、特定の制約を受けず、分離される特定の細胞内容物に適合するように選択することができる。例えば、クロマトグラフィー物質は、イオン交換マトリックスであり得る。

【0031】

適切なマトリックス物質には、例えばアガロース、シリカ、ニトロセルロース、セルロース、アクリルアミド、ラテックス、ポリスチレン、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリビニルアルコールなどのポリエチレンポリマー、ガラス粒子、ケイ酸カルシウム、ケイ酸マグネシウムおよびケイ酸アルミニウムなどのケイ酸塩、酸化チタンなどの金属酸化物、アパタイトおよびそれらの組み合わせが含まれる。好ましいマトリックス物質は、シリカゲルおよび／またはアガロースである。

【0032】

他の好ましい実施形態では、本発明による細胞内容物を回収する方法は、アフィニティーマトリックスを用いたクロマトグラフィー分離段階を含む。この種のアフィニティーマトリックスは、当技術分野で公知であり、例えば以下に示すリガンド系（マトリックス物質に結合するリガンド系、上記を参照のこと）を含む。

【0033】

アフィニティーリガンド：それによって分離される分子

抗原：特異性抗体

抗体：特異性抗原

抗体：特異性抗体

抗体（例えば抗ヒトIgG、抗マウスIgG）：ヒトまたはマウスからのIgG分子など、特定のカテゴリーの抗体

タンパク質Aまたはタンパク質G：特定のカテゴリーの抗体

ストレプトアビジンまたはストレプトアビジン標識融合タンパク質：ビオチン、アビジン、ビオチン標識もしくはアビジン標識融合タンパク質

グルタチオン：グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）またはGST融合タンパク質

セルロース：セルロース結合ドメイン（CBD）またはCBD融合タンパク質

カルモジュリン：カルモジュリン結合タンパク質（CBP）またはCBP融合タンパク質

アミロース：マルトース結合タンパク質（MBP）またはMBP融合タンパク質

イオン交換基：生体分子

疎水的相互作用に対するリガンド：生体分子

オリゴdT：例えば、mRNA分子のポリA領域

核酸：ハイブリッド形成核酸

核酸、定義された配列：特に、核酸結合生体分子、例えばタンパク質

タンパク質：相互作用パートナー（一般に、タンパク質、核酸、特定の配列の核酸、小さな生体分子）

小さな生体分子：タンパク質、核酸

細胞結合リガンド、例えばポリペプチド：細胞表面分子の結合を介した細胞

ファージ結合リガンド、例えばポリペプチド：ファージ表面への分子の結合を介したファージ

抗体：表面分子の結合を介した細胞またはファージ

【0034】

アフィニティーマトリックスの他の例は、タンパク質またはペプチドを精製するための金属キレートアフィニティーマトリックスである。Ni-NTAマトリックス（Qiagen社から入手可能）を用いて、6xHis標識タンパク質の精製において優れた結果が得られた（実施例を参照のこと）。

【0035】

マトリックス物質の形状は、特に制限されない；懸濁液またはメンブレン形状の物質を使用することが可能である。その例には、官能性が付与された各場合において、メンブレン、（単分散）ラテックスビーズ、連続ベッド物質、高分子クロマトグラフィー媒体、シリカ粒子等が含まれる。「官能性が付与された」とは、所望の細胞内容物との親和性相互作用に参加することが可能な基が存在することを意味するものである。懸濁液型のクロマトグラフィー媒体の詳細な一例としては、Ni-NTA superflow（Qiagen社から入手可能）が挙

げられる。

【0036】

本発明による、適切に細胞内容物を得る方法は、1つまたは複数の洗浄段階を含む。液体、つまりクロマトグラフィー物質に所望の細胞内容物が結合または沈殿した後の上清と、洗浄液との分離は、その出口端で圧力差をかける、特に減圧することにより、本発明に従って行うことが好ましい。必要であれば、隣接チャンバ内の液体による相互汚染を防ぐために、これらの追加の濾過および／またはクロマトグラフィー段階で、例えば消泡剤を添加するか、または移送ユニットを使用することによって適切な対策が取られる。

【0037】

特定の一実施形態では、廃棄されるべき液体（洗浄液等）は、排液ユニットを用いて排出される。この排液ユニットは、その入口端において上述のマルチチャンバ移送ユニットに対応する。つまり、マルチチャンバ濾過ユニットの出口端から個々のパッセージを通して上清が除去される。出口端において、これらの液体は、排液ユニットを通り廃棄物回収タンクに送られる。

【0038】

細胞内容物を回収または精製／分離するプロセスを行った後、細胞内容物を含有する溶液を、回収容器中、特にマルチチャンバユニットの個々のチャンバ中に別々に回収する。

【0039】

本発明による方法はまた、細胞内容物を分析および／または保存する段階を含む。分析段階は一般に、例えばアリコートを取ることと、電気泳動ユニット、例えばSDS-PAGEおよび／または分光光学ユニット、例えば質量分析計もしくはアッセイにおいて、それを設置することを含む。保存段階の詳細な例は、凍結乾燥である。

【0040】

本発明による方法は、複数の細胞内容物を回収するのに適しており、特にペプチド、ポリペプチド、核酸および／または代謝産物を得るのに適している。その必要条件は、1種または複数種の濾過、沈殿および／またはクロマトグラフィー

段階を用いて、他の物質から細胞内容物を分離するのに適した手順である。この方法は、ペプチドまたはポリペプチドを得るために使用することが好ましく、ポリペプチドは一般に、少なくとも50種のアミノ酸を含有する。

【0041】

そのポリペプチドには、例えば、任意に多数のサブユニットから構成される、かつ／または抗体若しくは酵素などの補欠分子団を含有するタンパク質、糖タンパク質およびリポタンパク質が含まれる。さらに、プロセス段階を適切に組み合わせることによって、同一ライセートから多数の細胞内容物を回収することが可能である。例えば、複合プロセス段階を用いて、ペプチドまたはポリペプチドを、アフィニティーマトリックスに結合させることによって分離することが可能であり、他の複合核酸では、例えばこれらのペプチドまたはポリペプチドをコードするプラスミドDNAを回収することが可能である。

【0042】

本発明による方法は、実験室規模で、つまりタンパク質含有出発溶液が供給されるマルチチャンバ濾過ユニットの各チャンバにおいて、50mlまで、好ましくは20mlまで、最も好ましくは0.1～2mlの容量でサンプルを迅速に同時処理することを特に企図するものである。

ハイスループット法において相互汚染を防止することに加えて、本発明による方法の他の利点には、特に：

清澄な細胞ライセートの同時調製の高度自動化と、
手作業の移送段階および／びピペッティング段階の回避と、
未精製細胞ライセートからの細胞内容物の回収の高度自動化と、
得られた高純度の細胞内容物の高収量と、
未変性条件下および変性条件下両方での、その方法の適用可能性と、
そのプロセスを自動化し、マルチチャンバユニットを用いることによる、エラーの原因の低減と、
そのプロセス速度と、
その系の適応性と、が含まれる。

【0043】

本発明による方法は、清澄なタンパク質含有溶液を回収すること、または生物サンプル、例えば大腸菌（E. Coli）などの原核生物、酵母菌属などの真核細胞、植物、動物およびヒト組織および培養細胞、昆虫細胞、菌類、古細菌等から細胞内容物を取り除くこと、例えば自動ファージディスプレイアッセイに適している。

【0044】

本発明による、ハイスループット（HT＝ハイスループット）法の実際の応用例は、例えば：

機能ゲノミクス：

ゲノム配列決定プロジェクト（例えば酵母菌ゲノムプロジェクト、ヒトゲノムプロジェクト）コンテキスト内の、タンパク質レベルでの遺伝子／オープンリーディングフレームのHTキャラクタリゼーション

機能プロテオミクス：

組換えタンパク質と、タンパク質およびペプチド複合体のHT精製；

表面（例えば、マイクロタイタープレート、マイクロ反応器、タンパク質チップ [マイクロアレイ] ）に固定化するサンプル標本としての組換えタンパク質、タンパク質およびペプチド複合体のHT精製；

活性物質スクリーニングプログラムに用いるサンプル標本としての組換えタンパク質のHT精製；

例えば細胞測定プロテオミクスプロジェクトのコンテキスト内で相互作用の研究に用いるサンプル標本としての組換えタンパク質、タンパク質およびペプチド複合体のHT精製；

例えば細胞測定プロテオミクスプロジェクト、活性物質スクリーニングプログラムの範囲内での、固定化、例えば6 x Hisタグ標識タンパク質との相互作用による、ペプチド、タンパク質、ペプチドもしくはタンパク質複合体および他の生体分子（例えば、核酸、炭水化物、脂質）の分離；

固定化された相互作用パートナー、例えばNi-NTAマトリックス上に固定化された6 x Hisタグ標識タンパク質との特異的相互作用（親和性強化、発現クローニング、パニング）を介して、特異的生体分子（例えばタンパク質）をそ

の表面に発現する全有機体（細胞、ファージ）の分離；

タンパク質レベルでの遺伝子発現分析（タンパク質発現プロファイリング）；
からなる。

【0045】

さらに本発明は、生物サンプルから清澄なタンパク質含有溶液を回収するための；

第1位置でマルチチャンバユニットを保持する手段と、

第2位置でマルチチャンバユニットを保持する手段と、

第1位置にある少なくともマルチチャンバユニットの入口端と出口端との間に圧力差をかける手段と、

第1位置にある少なくともマルチチャンバユニットの個々のチャンバに試薬を添加する手段とを備える装置の使用に関する。

【0046】

第1位置には、不溶性成分を含有するタンパク質含有溶液を受けるマルチチャンバ濾過ユニットを準備する。第2位置には、清澄なタンパク質含有溶液を回収するマルチチャンバ回収ユニットを設ける。特に、タンパク質含有溶液からペプチドおよび／またはポリペプチドを続いて回収することを意図する場合、第2位置のマルチチャンバユニットは一般に、もう1つのマルチチャンバ濾過ユニットまたはマルチチャンバクロマトグラフィーユニットである。

【0047】

第1位置にある少なくともマルチチャンバユニットの入口端と出口端との間に圧力差をかける手段は、入口端で過剰圧力を生じさせる、かつ／または出口端で減圧する手段からなる。これらの手段は、出口端に減圧装置を備えることが好ましい。第1位置のマルチチャンバユニットは、圧力差を生じることができるように、出口端から入口端が締め切られ、実質上密閉される。第1位置のマルチチャンバユニット入口端と出口端との間、または第1位置のマルチチャンバユニット入口端と第2位置のマルチチャンバユニット出口端の間に圧力差を生じさせる。その装置は任意に、第2位置のマルチチャンバ入口端と出口端の間に圧力差をかける手段もまた備える。

【0048】

試薬を添加する手段は、特にピペッティング手段、好ましくは溶解用溶液、洗浄用バッファー等を個々のチャンバに添加するためのマルチピペッティング手段を備える。

【0049】

第1位置および第2位置のマルチチャンバユニットは一般に、第1位置にある1つのユニットのチャンバ出口が、第2位置にある1つのユニットのチャンバ入口と整列するように位置合わせされている。これによって、濾過手段を通した後、第1位置にあるユニットのチャンバから第2位置にあるユニットのチャンバへの溶液の移送が確実に容易になる。

【0050】

この装置を使用して、ペプチドおよび／またはポリペプチドを回収する場合、第1位置にマルチチャンバ濾過ユニットを設け、第2位置にマルチチャンバ回収ユニット、好ましくはもう1つの濾過ユニットまたはクロマトグラフィーユニットを設ける。マルチチャンバ濾過ユニットを通して、ライセートを濾過した後、その清澄な溶液は、第2マルチチャンバ濾過ユニットまたはクロマトグラフィーユニットのチャンバ内に収容され、更なる操作に適用することができる。もう1つの濾過またはクロマトグラフィー段階については、少なくとも詳細な実施形態において、追加の真空ポンプが、第2位置のマルチチャンバユニットの出口端に必要である。第1位置のマルチチャンバユニットを取り除き、マルチチャンバユニットを第2位置から第1位置へ移動することによって、この必要が無くなる。特定の一実施形態では、その装置は次のように：

第1位置からマルチチャンバユニットを取り除く手段と、
第2位置から第1位置へマルチチャンバユニットを移送する手段と、
マルチチャンバユニットを第2位置へ移送する手段と、を備える。

【0051】

第2位置に設置した追加の第3マルチチャンバユニットは、マルチチャンバ濾過ユニット、クロマトグラフィーユニット、または回収ユニットであり、考えられるプロセスの特定の手順によって異なる。

【0052】

この装置は任意に、あるマルチチャンバユニットから次のマルチチャンバユニットへ溶液を汚染することなく移送するためのマルチチャンバ移送ユニットと、好ましくは、廃棄物回収タンクへ回収される、廃棄されるべき溶液を除去するためのマルチチャンバ排液ユニットと、を備える。排液ユニットは、減圧装置に連結することが好ましい。排液ユニットおよび／または移送ユニットは、移動可能に取り付けることが好ましく、排液ユニットの入口開口部は、マルチチャンバユニットの出口に操作的に連結されて、操作位置に実質上密閉が形成され、その一方、非操作位置には、マルチチャンバユニットの出口端から次のマルチチャンバユニットの入口端へ液体が通過するように、流路が開かれている。したがって、この装置は、マルチチャンバ排液ユニットを、第1および／第2位置にあるマルチチャンバの入口端に取り外し可能に取り付ける手段も含むことが好ましい。任意に、マルチチャンバユニットの出口端とマルチチャンバ排液ユニットの間の連結は、マルチチャンバ移送ユニットを介して設けることが可能である。同様に、第1および／または第2位置のマルチチャンバ移送ユニットを、操作と非操作位置の間に移動する手段を設けることが可能である。

【0053】

この装置はさらに、電気泳動装置および／または分光計などの細胞内容物を分析する手段、ならびにマルチチャンバ回収ユニットからアリコートを取る、かつ／もしくは分析用試薬を供給するための適切な調節器具および／または手段を備えることができる。その装置はまた、プロセスの少なくとも1段階を制御することが可能なソフトウェアを備えることが好ましい。そのソフトウェアは、プロセス段階の温度、持続時間、および圧力差を生じさせる手段を制御することが可能なことが好ましい。

【0054】

本発明はさらに、生物サンプルからタンパク質含有溶液をハイスルーブット法で回収する試薬キットであって、少なくとも1つのマルチチャンバ濾過ユニットおよび消泡剤および／または少なくとも1つのマルチチャンバ移送ユニットを含む試薬キットに関する。本発明による試薬キットは任意に、1つまたは複数のマ

ルチチャンバユニット、例えばマルチチャンバ受け入れユニットを含む。

【0055】

特定の実施形態では、本発明による試薬キットはさらに、細胞ライセートに用いる、好ましくはタンパク質可溶化条件下で細胞ライセートに用いる少なくとも1種の試薬を含む。その試薬キットは任意に、タンパク質および／またはペプチドを可溶化する1種または複数種の試薬も含む。

【0056】

好ましい実施形態において、本発明による試薬キットは、クロマトグラフィー物質を含む。クロマトグラフィー物質は、例えば懸濁液型の物質であり、個々の容器内に収容され、必要な時に使用者によって、マルチチャンバユニットの個々のチャンバ中に分配される。そのクロマトグラフィー物質は、既に分配状態である、つまりマルチチャンバクロマトグラフィーユニットの形を取ることが好ましい。メンブレン型のクロマトグラフィー物質もまた、本発明によるプロセスで直接使用するために、マルチチャンバクロマトグラフィーユニットの形で存在することが好ましい。

【0057】

本発明による試薬キットは任意に、平衡および洗浄用バッファーなどの従来の試薬、および／または例えばピペットチップなど、プロセス段階を行うのに必要な器具もまた含む。

【0058】

本発明は、以下に示す図および実施例によって完全に説明される。

【0059】

実施例

1. 96チャンバフォーマットの金属アフィニティークロマトグラフィー（マトリックス懸濁液）による、6 x His融合タンパク質の自動精製

【0060】

この実施例によって、96チャンバフォーマットの分配クロマトグラフィー物質（Ni-TNA super flow）による、減圧技術を用いた、大腸菌（E. coli）の細胞ライセートからのタンパク質の未変性条件下での自動精製

を示す。

【0061】

6倍アミノ酸ヒスチジン (6 x His-CAT) からなるアフィニティー標識を有する融合タンパク質として、タンパク質クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼを発現する大腸菌DH5 α 細胞を、24チャンバブロック (各チャンバは容積10mlを有し; 合計96バッチ) で容積5m中に培養し、培養が終了した後に、遠心分離により沈降させ、上清培地を除去した。その後のすべての段階を、実験用ロボット (BioRobot 9600、Qiagen社) を用いて行った。最初に、細胞沈降物を溶解用バッファー (50mMのNaH₂PO₄、pH8.0、300mMのNaCl、20mMイミダゾール、リゾチーム200 μ g/ml) 1ml中に取り、細胞を開き、完全に分解するように振とうした。その間に、Ni-NTA Superflowアフィニティーマトリックス (Qiagen社) を再懸濁し、他の96チャンバ濾過ユニットのチャンバ中に分配し (1チャンバ当たり総容積50 μ l)、そのマトリックスを平衡化し、このユニット (Ni-NTAプレート) を減圧チャンバの底部位置に配置した。Ni-NTAプレートの上に、濾過ユニット (例えばTurboFilter 96、Qiagen社) を上部位置に設置した。ライセートをTurboFilter 96濾過ユニットに移し; 次いでそのライセートをエタノール100 μ l (100% v/v) で覆い、減圧した。次いで、TurboFilter 96ユニットを取り除き、清澄なライセートを含有するNi-NTAプレートを、減圧チャンバの上部位置に移し、排液ブロックを底部位置に設置した。減圧することによって、清澄なライセートを、クロマトグラフィーマトリックスのベッドを通して吸引した; このプロセス中、6 x Hisタグ標識タンパク質はマトリックスに結合した。バッファー (50mM NaH₂PO₄、pH8.0、300mMのNaCl、20mMイミダゾール) 1mlを2回添加し、続いて減圧することによって、バッチを洗浄した。減圧チャンバの低位置にある排液ブロックをマイクロタイタープレートと取り替えた。溶出用バッファー (50mMのNaH₂PO₄、pH8.0、300mMのNaCl、250mMイミダゾール) 300 μ lを個々のチャンバに加え、減圧することによって、6 x Hisタグ標識タ

ンパク質をマイクロタイタープレートのチャンバ中に溶出した。

【0062】

チャンバ1～56の溶出画分中のタンパク質濃度をBradford分析によって決定した(表1)。6xHisCATの収量は、1チャンバ当たり21～240 μ gである(300 μ lで1回溶出)。各溶出画分5 μ lをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動し、続いてタンパク質バンドをクーマシーブリアントブルーで染色すると、精製したタンパク質は明らかに均一である(SDS-PAGE分析; 図示せず)。

【0063】

【表1】

96チャンバフォーマットの金属アフィニティークロマトグラフィー
(マトリックス懸濁液) による6 x His融合タンパク質の自動精製

ウェル	収量 (μg)		ウェル	収量 (μg)
A1	64		C2	88
A2	108		C3	84
A3	64		C4	74
A4	240		C5	72
A5	67		C6	91
A6	94		C7	191
A7	77		C8	109
A8	65		C9	70
A9	89		C10	91
A10	102		C11	90
A11	61		C12	60
A12	56		D1	84
B1	64		D2	71
B2	111		D3	88
B3	86		D4	93
B4	52		D5	81
B5	90		D6	21
B6	59		D7	98
B7	80		D8	40
B8	111		D9	77
B9	178		D10	62
B10	91		D11	44
B11	104		D12	135
B12	178		E1	54
C1	237		E2	76
E3	71		E6	91
E4	87		E7	84
E5	58		E8	84

収量 (μg) 平均 : 93

標準偏差 : 42

【0064】

2. 96チャンバフォーマットの金属アフィニティークロマトグラフィー (

メンブレン) による 6 x H i s 融合タンパク質の自動精製

【0065】

この実施例によって、96チャンバフォーマットのアフィニティーメンブレン (その中で重合したN i - N T A シリカ粒子を含有する) による、減圧技術を用いた、大腸菌細胞ライセートからのタンパク質の未変性条件下での自動精製を説明する。

【0066】

実施例2の基礎となる、実験に用いる装置および方法は、6 x H i s 融合タンパク質の結合に用いられるアフィニティーメンブレンが予め組み込まれている、96チャンバプレートを使用することを除いては、実施例1と同一である。N i - T N A シリカ粒子 (Q I A G E N 社) をメンブレンに組み込んだ。

【0067】

チャンバ1~62の溶出画分中のタンパク質濃度をB r a d f o r d 分析によって決定した (表2)。6 x H i s C A T の収量は、1チャンバ当たり50~250 μ g である (300 μ l で1回溶出した後)。各溶出画分5 μ l をS D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、続いてタンパク質バンドをクーマシーブリアントブルーで染色すると、精製したタンパク質は明らかに均一である (S D S - P A G E 分析; 図示せず)。

【0068】

【表2】

96チャンパフォーマットの金属アフィニティークロマトグラフィー
(メンブレン) による6 x H i s 融合タンパク質の自動精製

ウェル	収量 (μ g)		ウェル	収量 (μ g)
A1	250		C3	202
A2	169		C4	151
A3	174		C5	196
A4	149		C6	134
A5	179		C7	145
A6	93		C8	128
A7	152		C9	147
A8	131		C10	184
A9	171		C11	137
A10	156		C12	103
A11	123		D1	91
A12	106		D2	117
B1	225		D3	168
B2	176		D4	90
B3	148		D5	73
B4	153		D6	131
B5	148		D7	137
B6	143		D8	117
B7	129		D9	160
B8	137		D10	113
B9	126		D11	145
B10	130		D12	93
B11	246		E1	158
B12	102		E2	127
C1	129		E3	166
C2	190		E4	49
E5	121		E10	147
E6	59		E11	130
E7	170		E12	129
E8	98		F1	172
E9	145		F2	131

収量 (μ g) 平均 : 142

標準偏差 : 39

3. 96チャンバフォーマットのアニオン交換クロマトグラフィー（マトリックス懸濁液）による、クロラムフェニコール-アセチル-トランスフェラーゼ（CAT）の自動精製

【0070】

この実施例によって、96チャンバフォーマットの分配アニオン交換クロマトグラフィー物質（Q-Sepharose Fast Flow）による、減圧技術を用いた、大腸菌細胞ライセートからのタンパク質CATの未変性条件下での自動精製を説明する。

【0071】

実施例3の基盤を形成する実験に用いる装置および手順は、1つ変更が加えられているが、実施例1で使用した装置および手順と一致する。クロラムフェニコール-アセチル-トランスフェラーゼ（CAT）をアニオン交換クロマトグラフィーによって精製できるという事実を利用した。上述の試験において、Q-Sepharose Fast Flowアニオン交換マトリックス（Amersham Pharmacia Biotech社）の分配懸濁液を有する、96チャンバプレートを使用して、組換えタンパク質を結合させた（溶解用バッファー：50mMトリスHCl、25mMのNaCl、200 μ g/mlリゾチーム、pH7.0；結合用バッファー／洗浄用バッファー：50mMトリスHCl、25mMのNaCl、pH7.0；溶出用バッファー：50mMトリスHCl、500mMのNaCl、pH7.0）。

【0072】

チャンバ1～62の溶出画分中のタンパク質濃度をBradford分析により決定した（表3）。各画分5 μ lをSDSポリアクリルアミドゲル（SDS-PAGE15%）上に投入した。ゲル中のタンパク質バンドを、クーマシーブリリアントブルーで染色することによって視覚化した（図2）。次いで、CATを純度約40%に濃縮した。CATの収量は、1チャンバ当たり40～120 μ gである（200 μ lで1回溶出した後）。

【0073】

【表3】

96チャンバフォーマットのアニオン交換クロマトグラフィー
 (マトリックス懸濁液) による、クロラムフェニコール・アセチル・
 トランスフェラーゼの自動精製

ウェル	収量 (μg)		ウェル	収量 (μg)
A1	152		C3	152
A2	125		C4	266
A3	116		C5	157
A4	151		C6	222
A5	206		C7	138
A6	127		C8	163
A7	213		C9	125
A8	194		C10	166
A9	215		C11	159
A10	121		C12	108
A11	107		D1	149
A12	162		D2	146
B1	156		D3	141
B2	110		D4	132
B3	134		D5	117
B4	162		D6	240
B5	213		D7	192
B6	209		D8	209
B7	161		D9	147
B8	133		D10	206
B9	135		D11	153
B10	176		D12	112
B11	147		E1	118
B12	108		E2	169
C1	98		E3	165
C2	158		E4	301
E5	158		E10	149
E6	228		E11	204
E7	301		E12	110
E8	191		F1	172
E9	226		F2	131

収量 (μg) 平均: 165

標準偏差: 46

【0074】

4. 96チャンバフォーマットの金属アフィニティークロマトグラフィー（マトリックス懸濁液）による、真核細胞から発現した6 x His融合タンパク質の自動精製

【0075】

この実施例によって、96チャンバフォーマットの分配アニオン交換クロマトグラフィー物質（Ni-NTA Superflow）による、減圧技術を用いた、酵母細胞ライセートからの6 x His融合タンパク質の未変性条件下での自動精製を説明する。実施例4が基礎とする実験に用いる装置および手順は、本明細書中で記載の実験において、真核生物の酵母細胞中で発現した6 x Hisタグ標識タンパク質FBA1-アルドラーゼを精製したことを除いては、実施例1で使用した装置および手順と一致する。これを行うために、溶解条件を以下のように変更した：24チャンバブロックに培地5 ml中で培養した細胞を、溶解用バッファー（20 mm KH_2PO_4 / K_2HPO_4 、pH 7.4；1.2 Mソルビトール；1 mg/ml ザイモリアーゼ（zymolyase））中に再懸濁し、45分間振とうして、スフェロプラストの形成を補助した。次いで、プロテアーゼインヒビター、300 mm NaCl および0.4%（v/v）のTriton x-100を加えて、スフェロプラストを溶解し、その溶解混合物を、清澄化するために濾過ユニット（例えばTurboFilter 96、QIAGEN社）に移した。その後のすべての段階を実施例1に記載のように行った。

【0076】

溶出画分中のタンパク質濃度をBradford分析によって決定した（表4）。6 x His-FBA1アルドラーゼの収量は、1チャンバ当たり10～25 μg であった。SDS-PAGE分析によれば、精製したタンパク質は明らかに均一である（図示せず）。

【0077】

【表4】

96チャンパフォーマットの金属アフィニティークロマトグラフィー
 (マトリックス懸濁液) による、真核細胞から発現した6xHis融合
 タンパク質の自動精製

ウェル	収量 (μg)		ウェル	収量 (μg)
A1	15		E1	16
A2	16		E2	16
A3	11		E3	12
A4	21		E4	15
A5	13		E5	17
A6	19		E5	17
B1	16		F1	15
B2	24		F2	16
B3	8		F3	22
B4	9		F4	10
B5	17		F5	19
B6	15		F6	14
C1	16		G1	12
C2	10		D2	12
C3	16		G2	8
C4	12		D3	21
C5	11		G3	15
C6	17		D4	18
D1	18		H1	11
D2	14		H2	16
D3	17		H3	10
D4	16		H4	16
D5	18		H5	13
D6	15		H6	19

収量 (μg) 平均: 15

標準偏差: 4

【0078】

5. 96チャンパフォーマットの金属アフィニティークロマトグラフィー (マトリックス懸濁液) による、6xHisタグ標識融合タンパク質の変性条件下での自動精製

【0079】

この実施例によって、96チャンバフォーマットの分配クロマトグラフィー物質 (Ni-NTA Superflow) による、減圧技術を用いた、大腸菌細胞ライセートからのタンパク質の変性条件下での自動精製を説明する。

【0080】

6倍アミノ酸ヒスチジンからなるアフィニティー標識 (6xHis) を有する融合タンパク質として、チオレドキシンを発現する大腸菌M15/pREP4細胞を、24チャンバブロック (各チャンバの容積10ml; 合計96バッチ) で培養容積5m中に培養し、培養が終了した後に、遠心分離により沈降させ、上清培地を除去した。その後のすべての段階を、実験用ロボット (BioRobot 9600、Qiagen社) を用いて行った。最初に、細胞沈降物を溶解用バッファー (8M尿素、100mMの NaH_2PO_4 、10mMトリスHCl、pH 8.0) 1ml中に取り、細胞を開き、30分間振とうして、完全に分解するよう補助した。その間に、Ni-NTA Superflowアフィニティーマトリックスを再懸濁し、他の96チャンバ濾過ユニットのチャンバ (1チャンバ当たり総容積50 μ l) 中に分配し、そのマトリックスを平衡化し、このユニット (Ni-NTAプレート) を減圧チャンバの低位置に配置した。濾過ユニット (例えばTurboFilter 96、Qiagen社) をNi-NTAプレート上の上部位置に正確に位置決めした。ライセートをTurboFilter 96濾過ユニットに移し; 次いでそのライセートをエタノール100 μ l (p.a.) で覆い、減圧した。次いで、濾過を終了した後、TurboFilter 96ユニットを取り除き、清澄なライセートを含有するNi-NTAプレートを、減圧チャンバの上部位置に移し、排液ブロックを低位置に設置した。減圧することによって、清澄なライセートを、クロマトグラフィーマトリックスのベッドを通して吸引した; このプロセス中、6xHisタグ標識タンパク質がマトリックスに結合した。洗浄用バッファー (8M尿素、100mMの NaH_2PO_4 、10mMトリスHCl、pH 8.0) 1mlを2回添加し、洗浄用バッファー2 (8M尿素、100mMの NaH_2PO_4 、10mMトリスHCl、pH 6.3) 1mlを1回添加し、次いで減圧することによって、バッチを洗浄した

。減圧チャンバの低位置にある排液ブロックをマイクロタイタープレートに取り替えた。溶出用バッファー（8 M尿素、100 mMの NaH_2PO_4 、10 mMトリスHCl、pH 4.5）300 μl を個々のチャンバに加え、6 x His タグ標識タンパク質を、減圧することによってマイクロタイタープレートのチャンバ中に溶出した。

【0081】

チャンバ1～54の溶出画分中のタンパク質濃度をBradford分析によって決定した（表5）。6 x His 標識タンパク質の収量は、1チャンバ当たり86～252 μg であった。SDS-PAGE分析によれば、精製したタンパク質は明らかに均一である（図示せず）。

【0082】

【表5】

ウェル	収量 (μg)		ウェル	収量 (μg)
A1	110		C2	118
A2	131		C3	147
A3	185		C4	132
A4	198		C5	147
A5	100		C6	118
A6	114		C7	155
A7	192		C8	180
A8	156		C9	171
A9	248		C10	186
A10	180		C11	152
A11	161		C12	145
A12	160		D1	112
B1	129		D2	174
B2	130		D3	152
B3	143		D4	156
B4	197		D5	111
B5	142		D6	97
B6	221		D7	216
B7	203		D8	220
B8	157		D9	171
B9	182		D10	155
B10	153		D11	151
B11	167		D12	141
B12	156		E1	104
C1	131		E2	153
E3	140		E8	174
E4	137		E9	115
E5	86		E10	196
E6	183		E11	196
E7	252		E12	143
			F1	150
			F2	159

収量 (μg) 平均 : 156

標準偏差 : 36

【0083】

6. 96チャンバフォーマットの金属アフィニティークロマトグラフィーによる、相互汚染の無い、様々な6 x His融合タンパク質の精製

【0084】

この実施例によって、96チャンバフォーマットの分配クロマトグラフィー物質(Ni-NTA Superflow)による、減圧技術を用いた、大腸菌細胞ライセートからのタンパク質の未変性条件下での自動精製であって、これらの手段を用いることなく行われた精製と比較して、相互汚染を防ぐ手段を含む自動精製を説明する。

【0085】

実施例6が基礎とする実験に用いる装置および手順は、6 x His融合タンパク質を発現する様々なクローンを培地5 ml中で培養し、同時に処理することを除いては、実施例5に記載の装置および手順と一致する。相互汚染を防ぐために取られた手段(エタノールで覆う、排液ブロックを使用)は、実施例4に記載されている。

【0086】

指定の溶出画分アリコート5 μ lを95℃で4分間加熱し、SDS-PAGEによって分析し、続いて、タンパク質バンドをクーマシー染色した(図3)。本発明による方法を用いて精製した溶出画分のバンドパターン(図3a)から、6 x His融合タンパク質のうちの1種に相当するバンド1つのみが画分に現れ、この結果、相互汚染をこの方法により防ぐことができることが示されている。それとは対照的に、対照実験において、一部のケースでは、6 x His融合タンパク質に相当するいくつかのバンドを同定することができる(図3b、-によって示されるバンド)。

【図面の簡単な説明】

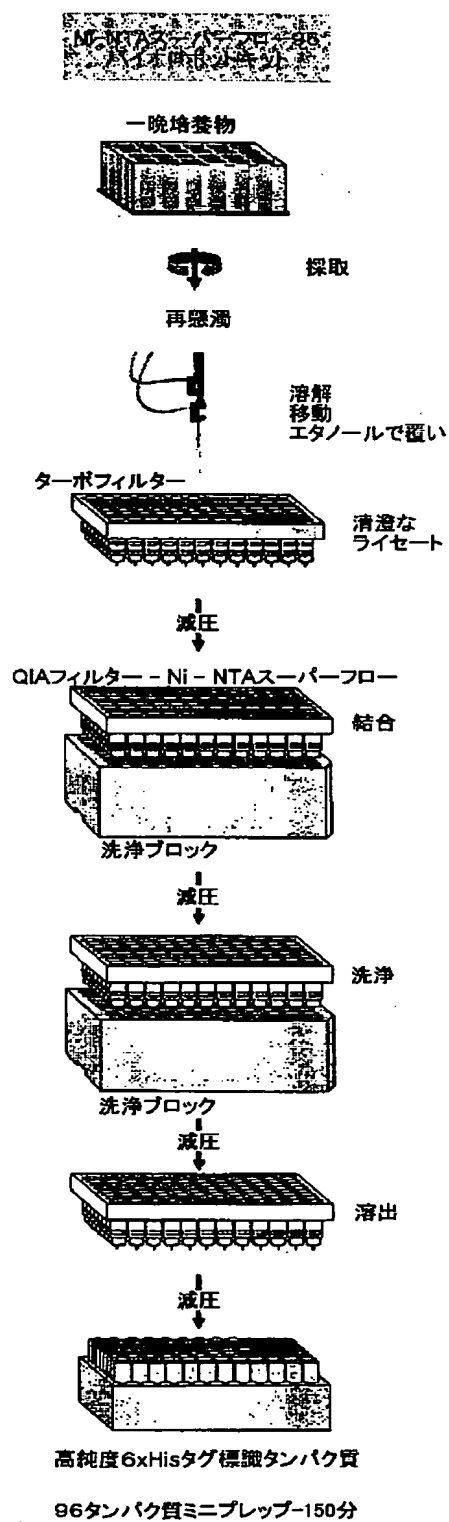
【図1】 本発明による方法の実施形態を示す図である。

【図2】 マトリックス懸濁液を用い、実施例3によるアニオン交換クロマトグラフィーによって精製されたCATのSDSポリアクリルアミドゲルを示す図である。

【図3】 図3aは、実施例6に記述した本発明による方法を用いて、金属

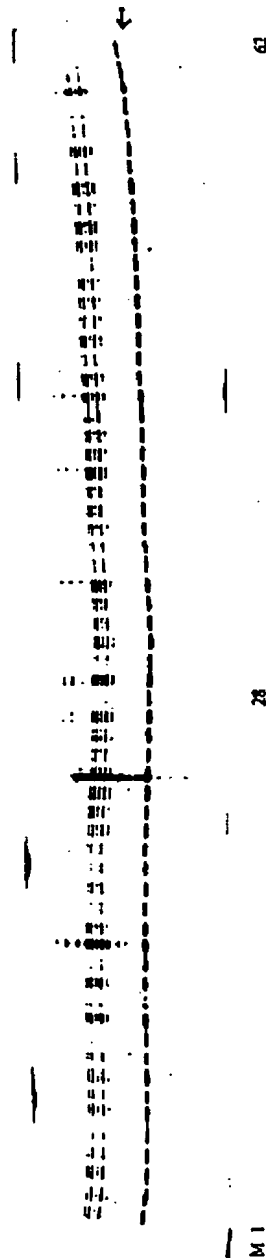
キレートアフィニティークロマトグラフィーによって精製された、様々な6 x H i s 融合タンパク質のSDSポリアクリルアミドゲルを示す図である。図3 bは、比較として、実施例6に記述した従来の方法を用いて、金属キレートアフィニティークロマトグラフィーによって精製された、様々な6 x H i s 融合タンパク質のSDSポリアクリルアミドゲルを示す図である。

【圖 1】



【図2】

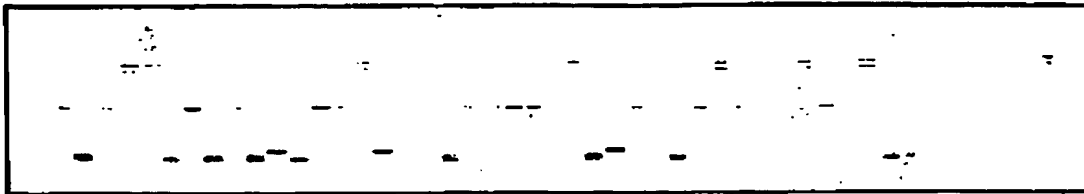
96穴フォーマットでのアニオン交換クロマトグラフィー
(マトリックス懸濁液)によるクロラムフェニコールアセチル
トランスフェラーゼ(CAT)自動精製



【図3】

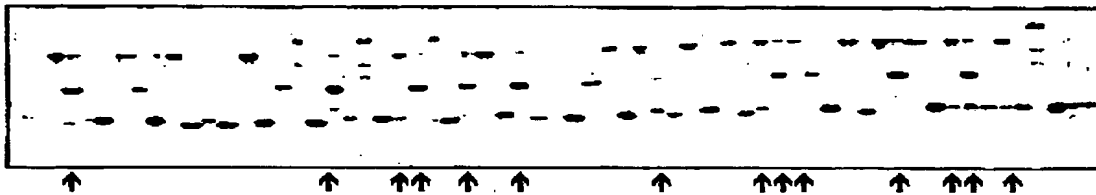
a

相互汚染のない自動精製



b

相互汚染を防止することなく行われた自動精製



【手続補正書】 特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】 平成13年12月17日 (2001. 12. 17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 特許請求の範囲

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞内容物を含有する清澄な溶液を生物サンプルからハイスルーブット法で回収する方法であって、

(a) マルチチャンバ濾過ユニットの個々のチャンバ中に不溶性成分を含有する複数のタンパク質含有溶液を調製する段階と、

(b) 前記溶液を、圧力差をかけることによって前記マルチチャンバ濾過ユニットに通して濾過し、不溶性成分を除去する段階であって、隣接チャンバの相互汚染が、前記細胞ライセートに消泡剤を添加すること、および／または前記マルチチャンバ濾過ユニットの出口端と前記回収容器の入口端との間に移送ユニットを用いることによって防止される段階と、

(c) 個々の濾液を回収容器中に別々に回収する段階と、を含む方法。

【請求項2】 前記消泡剤が、第一、第二もしくは第三C₁～₆アルコール、シリコーン消泡剤、非シリコーン消泡剤、植物をベースとする消泡剤、長鎖アルコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物から選択されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 (a) によるタンパク質含有溶液が、未精製細胞ライセートであることを特徴とする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 前記細胞溶解が、前記マルチチャンバ濾過ユニットの個々のチャンバ中で行われることを特徴とする、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記マルチチャンバ濾過ユニット内のフィルター孔径が、フィルターを通る濾液の流れの方向にしたがって小さくなることを特徴とする、請求項1から4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】 (c) による濾液から細胞内容物を回収することをさらに含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】 少なくとも1つの追加の濾過段階を含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 少なくとも1つのクロマトグラフィー分離段階および/または沈殿段階を含む、請求項6または7に記載の方法。

【請求項9】 イオン交換マトリックスまたはアフィニティマトリックスを用いた、クロマトグラフィー分離段階を含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 前記アフィニティマトリックスが、金属キレートアフィニティマトリックスであることを特徴とする、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 前記金属アフィニティマトリックスが、Ni-NTAマトリックスであることを特徴とする、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 前記マトリックスが、懸濁液であることを特徴とする、請求項9から11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】 少なくとも1つの洗浄段階をさらに含む、請求項6から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】 前記液体が、圧力差をかけることによって分離されることを特徴とする、請求項6から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】 廃棄されるべき液体が、排液ユニットを用いて除去されることを特徴とする、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 前記細胞内容物を分析する、少なくとも1つの段階をさらに含む、請求項6から15に記載の方法。

【請求項17】 前記細胞内容物が、マルチチャンバユニット中に回収されることを特徴とする、請求項6から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】 前記細胞内容物が、ペプチド、ポリペプチド、核酸、および代謝産物から選択されることを特徴とする、請求項6から17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】 生物サンプルから清澄なタンパク質含有溶液を回収するための、

マルチチャンバユニットを第1位置に保持する手段と、
マルチチャンバユニットを第2位置に保持する手段と、
第1位置にある少なくともマルチチャンバユニットの入口端と出口端との間に
圧力差をかける手段と、

第1位置にある少なくともマルチチャンバユニットの個々のチャンバに試薬を
添加する手段と、を備える装置の使用。

【請求項20】 第1位置にある1つのユニットのチャンバ出口が、第2位置にある1つのユニットのチャンバ入口と整列するように、前記マルチチャンバユニットが位置合わせされることを特徴とする、請求項19に記載の使用。

【請求項21】 前記装置が、
マルチチャンバユニットを第1位置から取り外す手段と、
マルチチャンバユニットを第2位置から第1位置へ移す手段と、
マルチチャンバユニットを第2位置へ移す手段と、を備えることを特徴とする、請求項19または20に記載の使用。

【請求項22】 前記装置がさらに、マルチチャンバ移送ユニットを備えることを特徴とする、請求項19から21に記載の使用。

【請求項23】 前記装置がさらに、マルチチャンバ排液ユニットを備えることを特徴とする、請求項19から22に記載の使用。

【請求項24】 前記装置がさらに、第1位置および/第2位置にあるマルチチャンバ出口端に、前記マルチチャンバ排液ユニットを取り外し可能に取り付ける手段を備えることを特徴とする、請求項23に記載の使用。

【請求項25】 前記装置がさらに、細胞内容物を分析する手段を備えることを特徴とする、請求項19から24に記載の使用。

【請求項26】 前記装置がさらに、少なくとも1つのプロセス段階を制御するソフトウェアを備えることを特徴とする、請求項19から25に記載の使用。

【請求項27】 生物サンプルからタンパク質含有溶液をハイスループット法で得るための試薬キットであって、

(a) 少なくとも1つのマルチチャンバ濾過ユニットと、

(b) 消泡剤および／または少なくとも1つのマルチチャンバ移送ユニットと

(c) 任意に、少なくとも1つのマルチチャンバ受け入れユニットと、を含む
試薬キット。

【請求項28】 細胞溶解に使用するための、少なくとも1種類の試薬をさらに含む、請求項27に記載の試薬キット。

【請求項29】 タンパク質および／またはペプチドを可溶化するための、少なくとも1種類の試薬をさらに含む、請求項27または28に記載の試薬キット。

【請求項30】 クロマトグラフィー物質をさらに含む、請求項27から29のいずれか一項に記載の試薬キット。

【請求項31】 前記クロマトグラフィー物質が、少なくとも1つのマルチチャンバクロマトグラフィーユニットの形をとる、請求項30に記載の試薬キット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. l. Application No. PCT/EP 00/07478
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K1/36 B01D29/01 B01D61/18 B01L9/06 B01L3/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K B01D B01L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data, EPD-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 339 769 A (COSTAR CORPORATION) 2 November 1989 (1989-11-02) the whole document	1-30
A	EP 0 249 932 A (THE GREEN CROSS CORPORATION) 23 December 1987 (1987-12-23) cited in the application the whole document	1-35
T	DE 198 34 584 A (QIAGEN) 3 February 2000 (2000-02-03) the whole document	1-35
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 February 2001		Date of mailing of the international search report 20/02/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 840-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 840-3018		Authorized officer Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 00/07478

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 339769 A	02-11-1989	US 4895706 A JP 2149321 A US 4948564 A	23-01-1990 07-06-1990 14-08-1990
EP 249932 A	23-12-1987	JP 62298536 A CA 1286696 A	25-12-1987 23-07-1991
DE 19834584 A	03-02-2000	NONE	

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N	30/48	G 0 1 N	R
	30/88	30/88	J
(72)発明者	スタイナー ケルスティン		
	ドイツ連邦国、ランゲンフェルド ディー		
	40764、シュナイダーシュトラッセ 5		
(72)発明者	リュベナウ ヘルゲ		
	ドイツ連邦国、ケルン ディー 50859、		
	マックス・アーンスト・シュトラッセ		
F ターム (参考)	4B029 AA09 BB01 CC01 HA05		
	4B050 CC07 DD02 FF10C LL05		
	4B063 QA01 QQ15 QS39		
	4H045 AA20 GA23 GA26		